

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10514

研究課題名(和文) Orbitrap LC-MS/MSを用いた薬毒物スクリーニングとメタボローム解析

研究課題名(英文) Drug Screening and Metabolome Analysis Using Orbitrap LC-MS/MS

研究代表者

奥田 勝博 (Okuda, Katsuhiko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00389115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Orbitrap LC-MS/Mを使用した薬物スクリーニングメソッドの開発として、ミックスモードカラムを利用した保持・分離条件を確立し、カラムの付替えをせずに2つの溶出時間が得られるメソッドを開発した。その分離・分析条件を用いて、司法解剖の鑑定のための薬毒物スクリーニングを施行し、約800例分のスキャンデータを蓄積した。死因別にそれらのデータを網羅的に解析したところ、死因によって減少傾向または上昇傾向にあるいくつかの化合物が見出されたが、その特異性は完全ではなく、腐敗による影響の除去が大きな課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本課題で確立した分析条件は、高極性化合物から低極性化合物まで幅広く保持・分離することができ、スキャンデータであることから事後に様々な解析が可能である。今後もデータを蓄積していくことで、死因診断マーカー発見の重要な礎になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the development of a drug screening method employing Orbitrap LC-MS/MS, analytical conditions were optimized using a mixed-mode column, permitting dual elution times without necessitating a column change. Under this condition, drug screenings were conducted for forensic autopsy evaluations, amassing scan data for approximately 800 cases. A thorough analysis of these data by cause of death unveiled several compounds exhibiting decreasing or increasing trends contingent upon the cause of death. However, significant challenges remained in terms of specificity and eliminating the effects of decomposition.

研究分野：法中毒学

キーワード：Orbitrap LC-MS/MS メタボローム 薬毒物スクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学における死因究明において、中毒の証明ないし否定は非常に重要である。そのようなことから、多くの大学の法医学講座において、質量分析計を用いた薬毒物スクリーニングが行われている。使用機器はガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC-MS)、液体クロマトグラフ/トリプル四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) がその殆どを占めている。その他少数ではあるが、ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) や液体クロマトグラフ/四重極飛行時間型質量分析計 (LC-QTOF) を併用している大学もある。

オービトラップ型イオントラップを有する電場型フーリエ変換質量分析計 (以下 Orbitrap MS) は、高周波や強磁場を必要としない、新しい原理に基づくイオントラップ型質量分析計である。解析にフーリエ変換を伴うために、非常に高い質量分解能および質量精度を発揮する。申請者の講座では、その Orbitrap MS の発展形で、従来のリニアイオントラップを組み合わせ、超高性能液体クロマトグラフ (UHPLC) に連結した Orbitrap LC-MS/MS システム (Q Exactive: サーマサイエンティフィック社製) を全国の法医学講座で初めて導入した。Q Exactive には法医学でのスクリーニング向けの分析条件やアプリケーション、ライブラリ等が存在せず、全く新たなスクリーニングメソッドを構築する必要がある。しかし、低分子化合物が苦手な高分解能 (最大 2 万) 質量分析計 LC-QTOF に対して、低分子化合物が得意な超高分解能 (最大 14 万) 質量分析計 Orbitrap LC-MS/MS は法医学と非常に相性のいい質量分析計と考えられ、実務はもちろぬ、研究の範疇においてもその利用価値は計り知れない。網羅的スキャンによって得られたデータには二次代謝産物も含まれ、そのデータを用いてメタボローム解析を行うことが可能となる。スキャンデータをオンラインデータベースに照合し、複数サンプル間の比較と多変量解析を行えるソフトウェア "Compound Discoverer" も法医学への応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究課題では、Orbitrap LC-MS/MS を用いた法医学分野に有用なスクリーニングやメタボローム解析法を確立し、実務と研究の両立を効率よく行うことを目的とする。そのためにまず、これまで一般的に用いられてきた ODS 系カラムを見直し、逆相分配と親水性相互作用による分配との 2 つの機能を持つミックスドモードカラムの採用を試みるのが第一の目的となる。その後、超高分解能を活かして得られたピークの質量電荷比から組成式を推定し、その組成式をデータベースに照らし合わせて化合物を特定する。そのためのデータベースをオンライン上から選定するとともに法医学に特化した化合物に関しては溶出時間を含んだ独自のデータベースを作成することで定性の精度を高める。また、ミックスドモードカラムを用いることで、糖やアミノ酸、サイトカインやペプチド等のいわゆる二次代謝産物の分離も可能になると考えており、通常のスクリーニングを施行しながら、病態や環境変化の指標となるバイオマーカーを見いだすような研究を実務と共に行えるようなメソッド開発、およびそれを用いたメタボローム解析による死因診断マーカーの検索を最終目的とする。

3. 研究の方法

Acclaim™ Mixed Mode HILIC-1 LC カラムの利用

逆相分配 (RP) および親水性相互作用 (HILIC) の 2 つの機能をもつカラムを利用することで、RP モードではこれまでの ODS 系カラムと同等の分離、HILIC モードではこれまで極性が高すぎて保持できなかったテトロドトキシンやメトホルミンなどの高極性化合物、更には糖やアミノ酸等も保持・分離できると考えている。グラジエント分析の平衡化時間を HILIC モードの分離に使い、カラムの付替えをせずに 2 つの溶出時間が得られるメソッドを開発する。

オンラインデータベースの選定と独自データベースの作成

フルスキャン分析で得られたデータは、精密質量電荷比から組成式の推定が可能であり、その推定組成式をデータベースに照らし合わせて化合物名をリストアップする。その際に解析ソフト Compound Discoverer はサーモサイエンティフィック社オリジナルのマススペクトルライブラリ (約 19,000 化合物) の他に約 280 種のオンラインデータベースを複数選択できる。例えば Cayman Chemical を選択すると比較的法医学に適した化合物が多いが、FooDB や PDB を選択すると栄養素やタンパク質など中毒分析には適さない化合物が検索される。また、PubMed や Wikipedia 等を選択すると、膨大な情報量となり解析処理に数時間～十数時間を要する。無限にあると思われる組み合わせの中から法医学に適したデータベースを選択するために、実サンプルを解析しながら検討を行う。更に、標準品を所有している化合物については、講座独自のデータベースとして、上記分析条件で得られた 2 種類の分離モードによる溶出時間を組み込むことで、より精度の高い定性分析ができる解析方法にする。

メタボローム解析

ヒトの体内には約 4000 種ともいわれる糖や有機酸、アミノ酸、脂肪酸などの低分子化合物が存在し、これら代謝産物の網羅的解析により、病態や環境変化、中毒や損傷に対する生体反応を捉えられることが期待される。2 種類の分離モードによって高極性から低極性化合物までをカバーでき、オンラインデータベース上にはほぼ全ての代謝産物データがあり、それを効率的に利用することによってこれまでの機器では限られていた解析範囲を大きく広げたメタボローム解析ができる方法を開発する。各死因別、例えば虚血性心疾患、ガン、感染症、老衰、焼死、凍死、失血死、溺死等に分類した解析データを多変量解析にかけ、寄与度の高い化合物を見つけ実験動物において確認することで、様々な死因の診断マーカーを見出す。

4. 研究成果

○LC-MS/MS 条件の検討

データ取得は事後でも様々な解析が可能なフルスキャンで行うこととした。MS/MS は、各データポイント上でシグナル強度の上位 10 イオンについて取得するモードにした。ただし、これでは微量の化合物のプロダクトイオンスペクトルが得られないので、シグナル強度に関わらず MS/MS 取得するイオンリストに法医関連化合物や多用されている医薬品など約 1500 化合物を登録した。

逆相分配 (RP) モードと親水性相互作用 (HILIC) モードの分離を一本で実現できるサーモフィッシャーサイエンティフィック社製の Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 カラムの使用を試み、粒子径 3 μm、流速を 0.3 mL/min とし時間短縮を計った。溶離液は水・アセトニトリル系を使用し、アセトニトリル濃度を上げていく RP モードで 15 分間の分析を行い、同じサンプルをもう一度注入し、今度はアセトニトリル濃度を下げていく HILIC モードで 15 分間の分析を行うこととした。これにより 30 分間で 2 つの保持時間を確認する可能となった。得られた保持時間は、前述のイオンリストに登録してそれぞれの精度を高めた。

○データベースの構築

フルスキャン分析で得られたデータを照らし合わせて化合物名をリストアップするのに利用するデータベースは、サーモサイエンティフィック社オリジナルのマスマスペクトルライブラリ (約 19,000 化合物) の他に 6 種のオンラインデータベース (Cayman Chemical、DrugBank、Human Metabome Database、KEGG、TCI、Toxin、Toxin-Target Database) を使用することが、薬毒物分析とともにメタボロームに利用できる化合物群を同定するのに適切であると考えられた。さらに講座独自のデータベースとして、上記分析条件で得られた 2 種類の分離モードによる溶出時間と実際の MS スペクトルを組み込むことで、より精度の高い定性分析ができるように工夫した。

○メタボローム解析

上記条件で得られた法医解剖約 800 事例分のデータを利用し、メタボローム解析を試みた。各事例の死因を一酸化炭素中毒、焼死、薬毒物中毒、海水溺水、淡水溺水、高所転落、頭部外傷、窒息 (溺水を除く)、内因性急性心機能不全、青壮年突然死症候群 (50 歳以下)、偶発性低体温症、敗血症、骨折後数日での死亡に分類し、これらに当てはまらないものや複数の要因が競合すると考えられるものはその他とした。解析には Thermo Fisher Scientific 社の低分子 LC-MS ソフトウェア Compound Discoverer を用い、代謝物データベースを用いた網羅的解析に加えて、アミノ酸のみまたは脂肪酸のみに対象を絞った解析などいくつかの方法を試みた。

死因によって上昇または減少傾向にあるいくつかの化合物が見出されたが、その特異性は完全なものではなかった (図 1)。一見腐敗の影響はないと認められる試料でも明らかに腐敗アミンの生成が進んでいる試料も多く認められ、これらを客観的に排除するための腐敗マーカーの設定が必要であると考えられた。

ソフトを用いた網羅的解析では、ピークの認識等の問題から目視による確認が必須となり、効率的な改善点が多く課題となった。一度に多くの事例を解析すると様々な要素が検出されて、死因との関係性が弱くなったことから、特定の死因について代表的な 5 例と対照 5 例とを比較する方法で、複数のグループを検討したところ、大きな改善が認められた。

本課題で確立した分析条件は、高極性化合物から低極性化合物まで幅広く保持・分離することができ、スキャンデータであることから事後に様々な解析が可能である。今後もデータを蓄積していくことで、新診断マーカー発見の重要な礎になると考えられる。

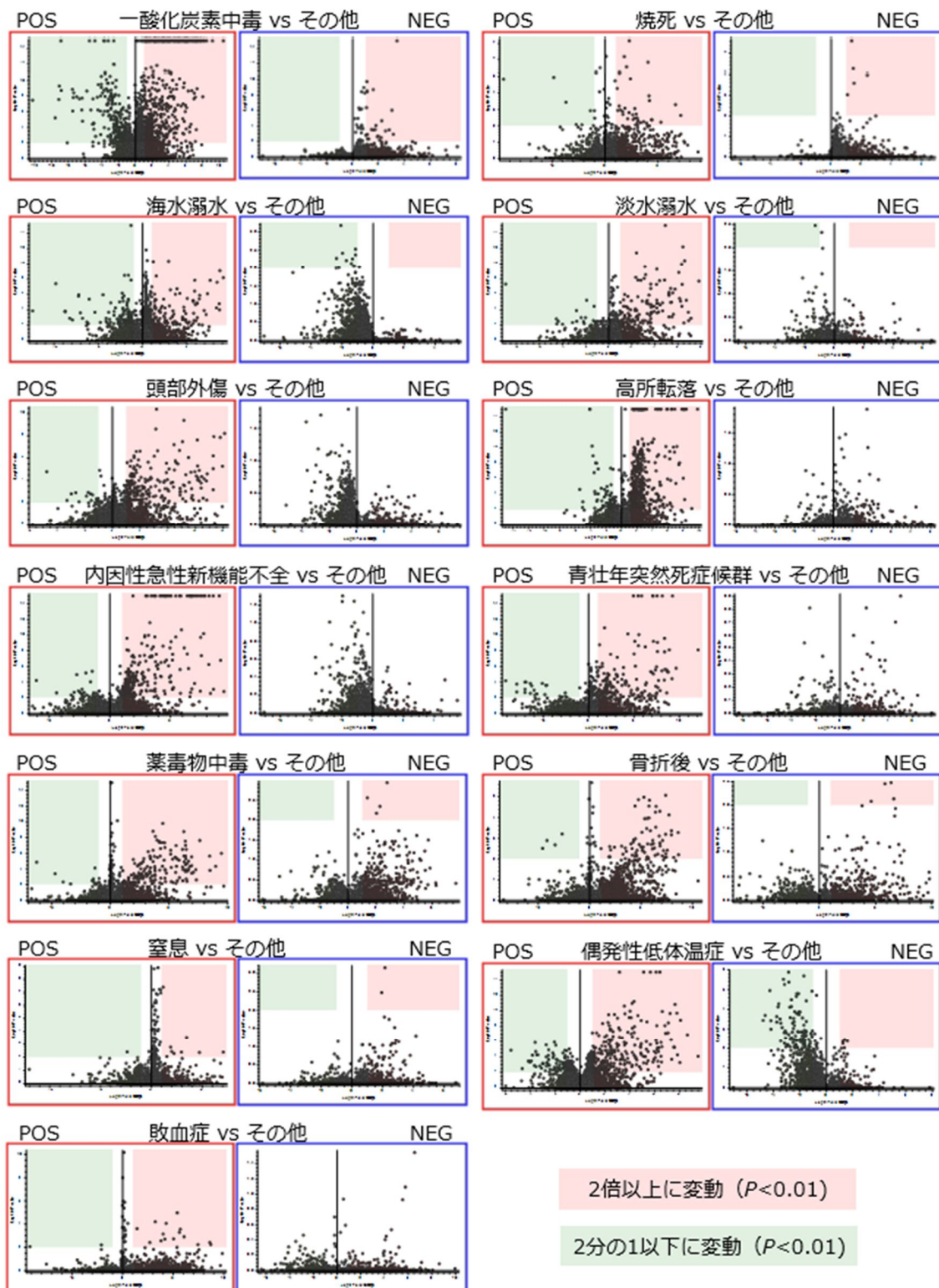


図1. HILIC モード分析時のボルケーノプロット

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田 勝博、浅利 優、高橋 悠太、森 香苗、難波 亮、清水 恵子
2. 発表標題 液体クロマトグラフ - 電場型フーリエ変換質量分析計およびミックスモードカラムを用いた薬毒物スクリーニング法の検討
3. 学会等名 日本法中毒学会第40年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田 勝博、浅利 優、高橋 悠太、森 香苗、難波 亮、清水 恵子
2. 発表標題 死因診断マーカーの発見を目的としたメタボローム解析法の構築
3. 学会等名 日本法中毒学会第42年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------